

TRANSLATOR'S VERIFICATION

Attached hereto is a foreign language document and an English translation of the relevant portions. I have made this translation and I believe it to be accurate.

I hereby declare that all statements made herein of my knowledge are true, and that all statements made on information and belief are believed to be true.

I have been warned that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both (18 U.S.C. 10001), and that any such statements may jeopardize the validity of any application, document or registration resulting therefrom.



Marina Banchetti

Rome, October 29, 2009



MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

IT 00/16



3/8

REC'D 18 MAY 2000

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. RM99A000069 DEL 29.01.1999

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li **22 MAR. 2000**

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

[Signature]

A. RICHIEDENTE(I) N.G.
P | F
1) Denominazione LAMBIASE Alessandro codice L M B L S N 6 6 R 1 0 H 5 0 1 Z
Residenza ROMA (RM)
2) Denominazione _____ codice _____
Residenza _____
B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.
Cognome e nome BANCHETTI Marina ed altri Cod. fiscale _____
Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) R M
C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) R M
D. TITOLO classe proposta (sez./cl./sol) _____ gruppo/sottogruppo _____
"Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari". -

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____
cognome e nome _____

E. INVENTORI DESIGNATI cognome e nome
1) LAMBIASE Alessandro 3) _____
2) _____ 4) _____
SCIOGLIMENTO RISERVE

F. PRIORITÀ
nazione o tipo di numero di domanda data di deposito Allegato N. Protocollo
organizzazione priorità
1) _____
2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione _____

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Doc. 1) 2 n. pag. 31 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) _____ n. tav. _____ disegno
Doc. 3) 1 Lettera d'incarico
Doc. 4) _____ designazione inventore
Doc. 5) _____ documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) _____ autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) _____ nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE
Data _____ N° Protocollo _____
Confronta singole priorità

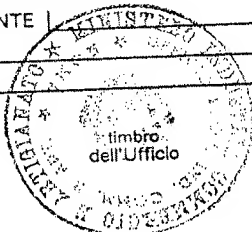
8) attestati di versamento, totale lire CINQUECENTO SESSANTACINQUEMILA obbligatorio
FIRMA DEL(I) LAMBIASE Alessandro UN MANDATO
RICHIEDENTE(I) _____ per se e per gli altri
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A. Marina Banchetti
CONTINUA S/NO N O (N° d'iscr. 483)
DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO S I

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI ROMA codice 518
VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA _____ Reg. A
L'anno millenovecento NOVANTANOVE, il giorno VENTINOVE, del mese di GENNAIO

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE
L'Ufficiale Rogante
Silvia Alberti

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 20 / 01 / 1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE(I)

RM 99 A 000 006 9

1) Denominazione

LAMBIASE Alessandro

2) Denominazione

D. TITOLO

"Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari".-

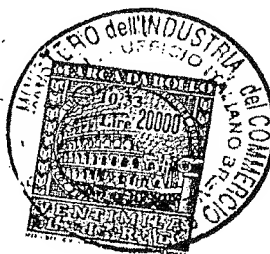
Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Il nerve growth factor (NGF), sotto forma di preparato per somministrazione sulla superficie oculare, viene proposto per l'uso nella terapia e/o nella profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari, con particolare riferimento ad affezioni interessanti la sclera, i corpi ciliari, il cristallino, la retina, il nervo ottico, il vitreo e la corioide. Applicato sotto forma di preparato oftalmico esterno, ad esempio in collirio o in unguento, il NGF è in grado di passare attraverso i tessuti oculari, ed è stato trovato che esso esercita un'azione terapeutica non solo in patologie retiniche e del nervo ottico, ma anche in affezioni che interessano le altre citate strutture interne dell'occhio.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE R M 99 A 000069

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione avente per titolo:

"Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari"

a nome: Alessandro LAMBIASE

Inventore: Lo stesso Richiedente

La presente invenzione riguarda l'uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari. Più in particolare, l'invenzione concerne l'impiego della neurotrofina denominata nerve growth factor (NGF) per il trattamento terapeutico delle strutture interne dell'occhio, come sclera, coroide, corpi ciliari, cristallino, vitreo, retina e nervo ottico, mediante semplice somministrazione topica sulla superficie oculare, ad esempio in forma di collirio o di pomata oftalmica.

Come è noto, il nerve growth factor (NGF) è una molecola capostipite di una complessa famiglia di neurotrofine, ben conosciuta per la sua azione trofica, tropica e differenziativa sui neuroni colinergici del sistema nervoso centrale e sul sistema simpatico periferico. È prodotta in molti tessuti di mammiferi, uomo compreso, e viene rilasciata nel torrente circolatorio in quantità più elevate durante la crescita e la differenziazione del sistema nervoso. Studi biologici, biochimici e molecolari condotti su sistemi cellulari in vitro hanno messo in evidenza una elevatissima omologia tra il NGF murino e quello umano. Inoltre, nell'uomo come in altre specie animali il NGF è normalmente presente sia nel liquor cerebrospinale che nel torrente ematico a concentrazioni dell'or-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

dine di 10-50 pg/ml, che aumentano in alcune patologie infiammatorie (malattie autoimmuni, allergiche, ecc.) e diminuiscono in altre (diabete).

Il NGF è stato scoperto dalla Prof. Rita Levi-Montalcini, nell'istituto di Zoologia della Washington University di St. Louis (Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, 1966) ed ha rappresentato un passo importante nello studio dei meccanismi di crescita e di differenziazione

della cellula nervosa, essendo in grado di influenzare lo sviluppo e il mantenimento delle funzioni biologiche e la rigenerazione dei neuroni. Per la scoperta di questa molecola, per averne caratterizzato il ruolo biologico sia nel sistema nervoso periferico che in quello centrale, nel 1986 fu assegnato alla Prof. R. Levi-Montalcini il premio Nobel per la Medicina e Fisiologia.

Numerosi studi sperimentali in vitro ed in vivo hanno dimostrato l'importanza fisiopatologica del NGF nel prevenire il danno neuronale di natura chirurgica, chimica, meccanica ed ischemica, rendendolo il candidato ideale per l'impiego nella terapia di numerose patologie del sistema nervoso centrale e periferico (Hefti F., J. Neurobiol., 25:1418, 1994; J. Fricker, Lancet, 349:480, 1997). Infatti, già da qualche anno sono state effettuate prove cliniche su pazienti affetti dal morbo di Parkinson e dal morbo di Alzheimer, mediante somministrazione intracerebrale di NGF murino (si veda, ad es., Olson L et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, 1992). I risultati di tali studi hanno confermato le osservazioni fatte su modelli animali ed hanno messo in evidenza l'assenza di possibili effetti collaterali in seguito alla somministrazione di NGF murino. Questa caratteristica è stata

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

confermata più recentemente per il NGF umano ricombinante (Petty B.G. et al., Annals of Neurology, 36:244-246, 1994).

Poiché fino dalla sua scoperta gli studi sulla caratterizzazione degli effetti biologici, biochimici, molecolari, preclinici e clinici del NGF sono stati condotti quasi esclusivamente con il NGF isolato dalle ghiandole sottomandibolari di roditori adulti, la più ampia quantità di dati

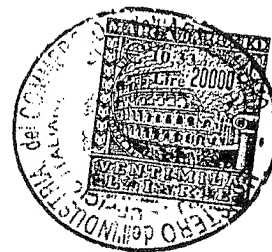
acquisiti riguarda attualmente il NGF murino. Le proprietà biochimiche di quest'ultimo sono state descritte, in particolare, in un lavoro che risale al 1968 (Levi-Montalcini R. e Angeletti P.U., Physiological Reviews, 48:534, 1968).

Il NGF contenuto nelle ghiandole salivari di topo è un complesso molecolare di 140 kdalton, con coefficiente di sedimentazione pari a 7S, costituito da tre subunità, α , β e γ , la seconda delle quali rappresenta la forma attiva vera e propria. Quest'ultima, detta β NGF, a coefficiente di sedimentazione pari a 2,5S, viene normalmente estratta e purificata seguendo tre metodologie non molto diverse tra di loro (Bocchini V., Angeletti P.U., Biochemistry, 64: 787-793, 1969; Varon S. et al., Methods in Neurochemistry, 203-229, 1972; Mobley W.C. et al., Molecular Brain Research, 387: 53-62, 1986).

Il β NGF ottenuto con tali metodiche è a sua volta un dimero di circa 13.000 dalton, costituito da due catene identiche di 118 amminoacidi. Ogni singola catena è stabilizzata da tre ponti disolfuro, mentre delle forze di legame non covalente garantiscono la formazione della struttura dimerica. Tale molecola, essendo molto stabile, risulta solubile pressoché in qualsiasi solvente sia acquoso che oleoso, conservando

Ing. Barzani & Barzani
Roma spa

inalterate le proprie caratteristiche biochimiche e l'attività biologica. Ulteriori dettagli sulla struttura e sulle proprietà fisiche e biochimiche della molecola sono riportati in Greene, L.A. e Shooter, E.M., Ann. Rev. Neurosci. 3:353, 1980.



Di recente, la struttura del β NGF è stata ulteriormente chiarita mediante un'analisi cristallografica. Questa ha rilevato la presenza di tre coppie antiparallele di filamenti, con struttura secondaria di tipo β , in grado di formare una superficie piana lungo la quale si associano le due catene per dare il dimero attivo. Su tali catene del β NGF si è evidenziata la presenza di quattro regioni "loop" in cui sono localizzati molti amminoacidi variabili ai quali, probabilmente, è legata la specificità di riconoscimento da parte del recettore.

L'effetto biologico del NGF è mediato da due recettori presenti sulla superficie delle relative cellule bersaglio. Esistono numerosi anticorpi che inibiscono selettivamente l'effetto biologico del NGF, la cui esistenza ha permesso e permette una accurata caratterizzazione e modulazione della sua azione, sia in sistemi cellulari che in vivo.

In tempi più recenti è stato possibile sintetizzare con tecniche di ingegneria genetica il NGF umano (Iwane, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 171:116, 1990), e sono anche divenute reperibili commercialmente piccole quantità di NGF umano. Tuttavia, da esperienze dirette si è riscontrato che l'attività biologica del NGF umano è molto bassa rispetto all'attività del NGF murino. Inoltre, è da tenere presente che la quasi totalità dei dati sull'uomo attualmente disponibili, sia in vitro che in vivo, sono stati condotti utilizzando il NGF murino, e che non

Ing. Parrano & Ranardo
Roma s.p.a.

sono mai stati riscontrati effetti indesiderati ricollegabili all'origine murina della molecola.

Studi condotti a partire dagli anni '90 su modelli animali hanno suggerito un possibile coinvolgimento del NGF in patologie oculari. Escludendo alcune pubblicazioni brevettuali in cui il NGF non è oggetto di effettivi risultati sperimentali, ma viene genericamente citato assieme

ad altri fattori di crescita noti (nell'infondata assunzione che si tratti di un insieme omogeneo di molecole con caratteristiche ed azioni biologiche equivalenti), e ad eccezione della domanda di brevetto internazionale PCT pubblicata con il No. WO 98/48002, dello stesso attuale richiedente, in cui il NGF viene proposto per l'uso nella terapia di patologie della cornea e della congiuntiva (e di cui si tratterà in seguito), il materiale scientifico pubblicato in campo oftalmico riguarda esclusivamente l'impiego del NGF in affezioni retiniche e del nervo ottico.

In particolare, è stata riportata l'efficacia della somministrazione intraoculare di NGF, in modelli animali, nell'aumentare la sopravvivenza delle cellule gangliari retiniche in seguito ad ischemia acuta retinica (Siliprandi R. et al., *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34:3232, 1993) e in seguito a transezione del nervo ottico (Carmignoto G. et al., *J. Neurosci.*, 9:1263, 1989). Più recentemente, la somministrazione per iniezione intravitreale o anche retrobulbare di NGF è risultata efficace in un modello di degenerazione retinica nel topo simile alla retinite pigmentosa umana (Lambiase A. e Aloe L., *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 234:S96-S100, 1996), e in un modello di danno retinico da ipertensione oculare nel coniglio (Lambiase A. et al., *Graefe's Arch. Clin. Exp.*

Ing. Barranò & Tanardo
Roma s.p.a.

Ophthalmol., 235:780-785, 1997).

I lavori sperimentali citati hanno dimostrato che la somministrazione locale di NGF è in grado di prevenire od almeno ritardare la morte delle cellule gangliari retiniche e dei fotorecettori durante le suddette patologie. Inoltre, in nessuno di tali studi sono stati evidenziati effetti collaterali sull'animale. Tuttavia, è da notare che in tutte le pubblicazioni

sopra citate il NGF viene somministrato ai tessuti oculari interni tramite iniezione intravitreale o retrobulbare.

La domanda di brevetto internazionale PCT pubblicata con il No. WO 98/48002, già menzionata, risulta essere finora l'unico documento in cui è descritto l'uso di NGF per applicazione oftalmica esterna, ad esempio in forma di collirio o di pomata. Il lavoro sperimentale ivi riportato dimostra come la somministrazione topica di NGF sia in grado di risolvere con successo le patologie della superficie oculare (cornea e congiuntiva) sia di natura congenita che acquisite e, in particolare, varie patologie su base distrofica o neurodistrofica per le quali non esistevano precedentemente validi trattamenti terapeutici. Presupposto per tale risultato innovativo era stata l'individuazione della presenza di NGF e del recettore ad alta affinità per il NGF (TrkA, tirosinchinasi A), con tecniche di immunoistochimica, nei tessuti corneali. Evidentemente, l'espressione del recettore ad alta affinità per il NGF è una condizione indispensabile perché questo fattore possa svolgere la propria azione terapeutica.

Nell'ambito degli studi che hanno portato alla presente invenzione, sempre utilizzando tecniche immunoistochimica e immunofluore-

Ing. Parrano & Parrano
Roma spa

scenza (Lambiase A. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 100:408-414, 1997), nonché tecniche biomolecolari di identificazione in situ dell'RNA messaggero per il nerve growth factor (Micera A. et al., Archives Italiennes de Biologie, 133:131-142, 1995), si è trovato che tutte le cellule della sclera, della capsula anteriore del cristallino, dell'epitelio dei corpi ciliari, le fibre del nervo ottico, le cellule gangliari retiniche, le cellule

dell'epitelio pigmentato retinico ed alcune cellule della coroide non solo esprimono il recettore ad alta affinità del NGF, ma sono anche in grado di produrre questa neurotrofina (dati non ancora pubblicati). Le implicazioni di questo risultato sperimentale sono molteplici: da un lato il NGF, rilasciato dalle cellule dei vari tessuti oculari, svolgerebbe un ruolo trofico e fisiopatologico in tutti i meccanismi riparativi oculari, e dall'altro numerose patologie di origine trofica, degenerativa o immunitaria riconoscerebbero come momento eziologico fondamentale il mancato rilascio del NGF.

Inoltre, dato che gli effetti che sono stati osservati dopo somministrazione di NGF esogeno avvengono a concentrazioni pressoché fisiologiche (nell'ordine di alcuni microgrammi) è ipotizzabile che un possibile meccanismo fisiopatogenetico in alcune affezioni oculari sia una riduzione dei livelli locali del NGF sotto la soglia in grado di garantire l'integrità dei tessuti. Tale ipotesi patogenetica trova conferma da alcuni dati presenti in letteratura sugli effetti della deprivazione di NGF, che induce sia in vitro che in vivo la morte di diverse popolazioni cellulari e l'esacerbazione di danni tissutali di natura chimica, fisica, infettiva o degenerativa (Aloe L., Int. J. Devl. Neuroscience, vol. 5(4), 1987; Lam-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

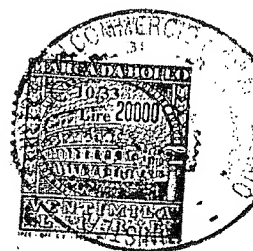
biase A. e Aloe L., 1996, già cit.; Lambiase et al., Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1997, già cit.)

In tale quadro, benché i risultati di cui sopra consentano di ipotizzare un'attività terapeutica del NGF anche su strutture e tessuti oculari diversi da quelli per cui tale attività è già riportata in letteratura, e in modo specifico sulla sclera, i corpi ciliari, il cristallino, il vitreo e la

coroide, si pone tuttavia il problema di un'agevole somministrazione del principio attivo ai tessuti interessati. Diversamente dal caso considerato nella domanda di brevetto PCT pubbl. No. 98/48002, relativa a patologie della cornea e della congiuntiva, in questo caso si tratta, infatti, di tessuti interni al bulbo oculare.

La possibilità di somministrare un agente terapeutico oftalmico per via topica esterna, cioè in forma di collirio o pomata, rappresenta un notevole beneficio rispetto alle vie di somministrazione topica parenterale, per iniezione retrobulbare o intravitreale. Infatti, l'utilizzazione di queste ultime metodiche comporta il rischio di numerose complicanze, riportate in letteratura, tra cui la perforazione del bulbo oculare, sovrainfezioni, emorragie e lesioni di strutture anatomiche durante l'iniezione. Simili complicanze si possono verificare anche con una maggiore frequenza qualora si ipotizzi un trattamento di patologie croniche, e ciò potrebbe portare all'impossibilità di praticare la terapia per un'inversione del rapporto rischi/benefici.

È stato ora inaspettatamente trovato che somministrando il NGF sotto forma di collirio si ottiene un aumento dei livelli di tale neurotrofina in tutti i tessuti oculari, inclusi quelli interni al bulbo oculare. Co-



Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

me sarà più dettagliatamente illustrato nel rapporto sperimentale riportato nel seguito, il passaggio della molecola del NGF dalla superficie oculare su cui veniva somministrato verso i tessuti interni dell'occhio è stato dimostrato impiegando sia una metodica autoradiografica (Levi-Montalcini, R. e Aloe L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7111-7115, 1985) che un dosaggio immunoenzimatico (Bracci-Laudiero, L. et al.

Neurosci. Lett. 147:9-12, 1992). Applicando quest'ultimo metodo su conigli trattati con instillazione congiuntivale di NGF in soluzione salina è stato rilevato, un'ora dopo la somministrazione, un aumento della concentrazione di NGF a livello di tutti i tessuti oculari esaminati. Tale aumento di concentrazione si riduce fino a tornare ai livelli basali dopo 6-8 ore. Ciò permette al NGF di esplicare la propria azione terapeutica anche nei tessuti non direttamente interessati da una sua somministrazione superficiale. Questo aspetto è innovativo non solo per tutte quelle patologie oftalmiche per cui l'efficacia terapeutica del NGF non era stata finora neanche ipotizzata, ma anche per le patologie retiniche e del nervo ottico, dove una potenziale azione del NGF era già stata riportata, ma non era possibile somministrare il farmaco in modo agevole e privo di pericoli e controindicazioni per il paziente.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione, secondo un suo primo aspetto, l'uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per somministrazione sulla superficie oculare, per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari. In modo specifico, detto preparato oftalmico a base di NGF è in forma di soluzione o di sospensione (collirio), di un-

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

guento, di gel o di pomata con un veicolo oftalmico farmaceuticamente accettabile, tollerato dall'occhio e compatibile con il principio attivo. È anche possibile prevedere particolari forme di somministrazione oftalmica a rilascio protratto, come inserti oculari erodibili o sistemi "reservoir" a membrana polimerica da disporre nel sacco congiuntivale. In alternativa il NGF, o un preparato che lo contiene, può essere aggiunto ad un bendaggio locale con lente a contatto terapeutica.

Come già notato, detto preparato oftalmico è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie della sclera, dei corpi ciliari, del cristallino, della retina, del nervo ottico, del vitreo e della coroide, dette patologie potendo essere su base trofica, post-traumatica, infettiva, post-chirurgica, autoimmune, distrofica, degenerativa, post-infiammatoria e conseguente a trattamento laser. Come sarà confermato dai dati sperimentali riportati in seguito, la somministrazione topica esterna di NGF è risultata in grado, tra l'altro, di indurre una riparazione delle lesioni sclerali di origine traumatica o immunitaria, di causare un aumento della produzione di umore acqueo, ripristinando il tono oculare nelle patologie caratterizzate da ipotono ed evolventi in tisi bulbare, e di prevenire e ritardare la formazione e la progressione di opacità del cristallino (cataratta). In relazione alle patologie retiniche, la somministrazione di NGF per applicazione sulla superficie oculare induce un aumento dello spessore delle fibre nervose, una sopravvivenza delle cellule gangliari retiniche, dei fotorecettori e dell'epitelio pigmentato in condizioni di patologie degenerative, ischemiche, traumatiche e di danni da ipertono oculare. In relazione al nervo ottico, gli effetti ottenuti sono

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

un miglioramento dei potenziali evocati visivi (PEV), del campo visivo e della sopravvivenza delle fibre nervose in caso di patologie traumatiche, ischemiche, pressorie e degenerative. Infine, a livello coroidale la somministrazione di NGF per applicazione oftalmica esterna causa una riduzione dei processi infiammatori a carico della coroide, e a livello del vitreo essa riduce il numero dei corpi mobili vitreali. È da notare che molti di questi disordini risultano a tutt'oggi di difficile approccio terapeutico o del tutto privi di un trattamento efficace.

La possibilità che il nerve growth factor manifestasse un'azione biologica sui tessuti interni del bulbo oculare in seguito a somministrazione locale esterna era difficilmente prevedibile soprattutto in considerazione del fatto che, come sopra evidenziato, il NGF è una molecola di notevoli dimensioni (26.800 dalton) con una struttura complessa. A affinché una molecola possa agire a livello dei tessuti oculari profondi è necessario che una volta instillata sulla superficie dell'occhio essa penetri attraverso il film lacrimale, la cornea, l'umore acqueo ed il vitreo, per potersi distribuire a tutti i tessuti. Nella pratica corrente non sono note molecole (in modo particolare, antibiotici o cortisonici) in grado di penetrare fino a livello del cristallino, del vitreo e della retina mantenendo una concentrazione terapeuticamente valida. Quanto precede rende conto del fatto che tutti gli studi noti riguardanti l'impiego di NGF in patologie oculari hanno adottato la via di somministrazione intraoculare.

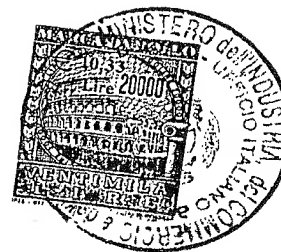
In realtà, il NGF, pur presentando una struttura complessa e con elevato peso molecolare, ha gruppi strutturali sia di natura idrofila che idrofobica, potendo così passare le barriere anatomiche di natura

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

sia lipidica che idrofila. Inoltre, una sua caratteristica fondamentale è che una volta raggiunti gli organi bersaglio in concentrazioni anche minime, ma biologicamente attive, il NGF è in grado di stimolare una produzione endogena, da parte del tessuto, dello stesso NGF. La presenza di una componente di produzione endogena è chiaramente suggerita dai risultati della sperimentazione sul passaggio di NGF attraverso i tessuti, che verranno mostrati più avanti. Tali risultati mostrano anche che non è conservato un gradiente di concentrazione dalla superficie esterna dell'occhio verso i tessuti più profondi, come era ipotizzabile per una semplice meccanismo di diffusione attraverso i tessuti.

Ai fini della produzione del preparato secondo la presente invenzione, adatte metodiche di estrazione e purificazione del NGF sono riportate nella letteratura precedentemente citata. Per gli scopi sperimentali dell'invenzione si è adottata la tecnica di Bocchini e Angeletti, qui sinteticamente riportata. Vengono prelevate sterilmente le ghiandole sottomascellari di topi maschi adulti, e i tessuti vengono omogeneizzati, centrifugati e dializzati; quindi la sospensione viene fatta passare attraverso successive colonne di cellulosa, su cui rimane adsorbito il NGF. Il NGF viene quindi eluito dalla colonna mediante un tampone contenente cloruro di sodio 0,4 M. I campioni così ottenuti vengono letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 280 nm per identificare le frazioni contenenti il NGF. Queste ultime vengono dializzate ed il NGF così ottenuto viene liofilizzato sterilmente e conservato in frigorifero a -20 °C.

Un prodotto medicinale secondo l'invenzione adatto per som-



Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

ministrazione sulla superficie oculare contiene preferibilmente, da solo o in associazione con uno o più altri principi attivi, da 1 a 1000 µg/ml di NGF. Nel caso in cui il prodotto in questione sia una soluzione acquosa (collirio) la concentrazione può essere compresa, di preferenza, tra 10 e 500 µg/ml. Una formulazione specifica per collirio può contenere, ad esempio, 200 µg/ml di NGF in soluzione fisiologica allo 0,9 % di cloruro

di sodio, oppure in soluzione salina bilanciata (BSS®): in entrambi i casi, si tratta di una soluzione isotonica con la lacrime e quindi ben tollerata dall'occhio. Tuttavia, è anche possibile utilizzare soluzioni ipotoniche.

Alle soluzioni saline a base di NGF, da solo o in associazione con altre molecole biologicamente attive e/o coniugato con molecole carrier (come ad es. la transferrina) con lo scopo di favorirne ulteriormente il passaggio attraverso la superficie oculare, possono essere aggiunti altri eccipienti scelti tra quelli correntemente usati in tecnica farmaceutica, ad esempio al fine di tamponare le soluzioni o sospensioni, per rendere stabile il principio attivo e ben tollerato il preparato. In modo specifico, i tamponi dovrebbero mantenere il pH nel campo 4-8. Ad esempio, la soluzione di cloruro di sodio di cui sopra può essere tamponata con uno qualsiasi dei tamponi ben noti nella tecnica farmaceutica per l'uso oftalmico, tra i quali il tampone fosfato, o il tampone trizma (tri-idrossimetil-amminometano), in maniera da avere un pH fisiologico, pari a 7,0-7,4, mantenendo al tempo stesso una osmolarità fisiologica (295-305 mOsm/l).

La tollerabilità può essere ancora migliorata mediante l'impiego di eccipienti quali il polisorbato 80 (o Tween 80), il destrano, il polieti-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

lenglicole (ad es. PEG 400) e prodotti simili. La formulazione può contenere anche agenti viscosizzanti quali acido ialuronico, metilcellulosa, polivinilalcole, polivinilpirrolidone ed altri, con l'obiettivo di aumentare la biodisponibilità oculare, la stabilità e la tollerabilità del principio attivo. La biodisponibilità oculare del NGF può essere ulteriormente incrementata mediante l'impiego di sostanze che aumentano la permeazione corneale del farmaco quali, ad esempio, il dimetilsolfossido, i taurocolati, i fosfolipidi di membrana e vari tensioattivi di impiego oftalmico. Inoltre, si potrà aggiungere alla formulazione un agente conservante ad attività antimicrobica per prevenire contaminazioni.

Per prodotti da somministrare in sospensione si potrà impiegare un agente quale la carbossimetilcellulosa o altri prodotti simili, mentre nel caso in cui si voglia impiegare la formulazione in unguento, in gel o in pomata oftalmica il NGF potrà essere veicolato con eccipienti quali polietilenglicoli, poliacrilati, polietilenossidi, acidi ed alcoli grassi oppure lanolina, paraffina ed altri prodotti simili.

Come già notato, l'attività terapeutica del nerve growth factor nei confronti di tessuti oculari diversi da quelli superficiali (cornea e congiuntiva), dalla retina e dal nervo ottico non risulta descritta in precedenza, né per somministrazione mediante iniezione intraoculare né tanto meno per somministrazione di formulazioni in collirio o in pomata. Pertanto, costituisce un ulteriore oggetto specifico dell'invenzione l'uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari, ad esclusione delle patologie retiniche e del nervo ottico,

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

qualsiasi sia la via di somministrazione prevista.

Anche in questo caso, la concentrazione di NGF nel preparato è preferibilmente nel campo tra 1 e 1000 µg/ml di NGF, e sono possibili tutte le scelte formulative ben note nella tecnica, e in particolare quelle indicate precedentemente con riferimento alle formulazioni oftalmiche per applicazione esterna.

Alcuni risultati sperimentali ottenuti nell'ambito della presente invenzione, inclusi i dati clinici relativi ad applicazioni terapeutiche sull'uomo, vengono riportati a titolo meramente esemplificativo nel seguito.

Studi sul passaggio di NGF attraverso i tessuti oculari

In una prima serie di prove per valutare il passaggio del NGF intraocularmente dalla superficie esterna su cui veniva somministrato è stata impiegata la metodica dell'autoradiografia, già citata, su un gruppo di sei conigli. A ciascuno degli animali è stata somministrata, per instillazione nel fornice congiuntivale, una goccia di collirio (50 µl) contenente 10 µg di NGF marcato con ^{125}I (concentrazione: 200 µg/ml).

È stato impiegato NGF murino purificato secondo la metodica precedentemente descritta, e successivamente coniugato con Na-I^{125} (Amersham Italia, IMS30, 1mCi) secondo la metodica della cloramina T (Lapack PA. Exp. Neurol. 124:1620, 1993). La quantità di NGF marcato è stata valutata per cromatografia utilizzando una colonna Sephadex G-25. La quantità di prodotto precipitabile marcato con ^{125}I era compresa tra il 90 e il 95%, dimostrando che la maggior parte del radioattivo era legato al NGF. L'attività specifica del NGF-I 125 era compresa tra 1 e 1,5

Ing. Barzani & Barzani
Roma spa

Ci/ μ mol.

Due ore dopo la somministrazione del NGF marcato gli animali venivano sacrificati, e gli occhi enucleati e fissati in paraformaldeide al 4% per 48 ore. Quindi i campioni, dopo incubazione in saccarosio al 30% per 24 ore, venivano tagliati al criostato in sezioni di 15 μ m di spessore e le sezioni venivano montate su vetrini gelatinati, immerse in

un'emulsione fotografica (Ilford K2) e incubate per 4 settimane a 4°C.

Le sezioni venivano quindi deidratate con etanolo, montate con DPX dopo trattamento con xilolo ed esaminate con un microscopio ottico Zeiss.

Questo esperimento dimostrava che il NGF marcato, una volta somministrato sulla superficie oculare, era in grado di penetrare all'interno dell'occhio, e di legarsi alle cellule dei vari tessuti oculari del segmento posteriore e del cristallino che esprimevano il recettore specifico.

In una seconda serie di prove sono stati valutati quantitativamente i livelli di NGF nei vari tessuti oculari dopo somministrazione di una goccia di NGF murino nel fornice congiuntivale, impiegando la tecnica immunoenzimatica già citata. Sono stati utilizzati un totale di 24 conigli, di cui 6 sono stati sacrificati immediatamente per la determinazione dei valori basali di concentrazione del NGF nei vari tessuti oculari. Gli altri animali sono stati sacrificati dopo 1 ora (6 conigli), 2 ore (6 conigli) e 8 ore (6 conigli) dalla somministrazione del collirio.

In tutti i casi gli occhi sono stati enucleati e dissezionati nei vari tessuti (cornea, sclera, acqueo, iride, cristallino, vitreo, retina, coroide, nervo ottico). Dopo essere stati pesati, i tessuti sono stati sonicati (uti-



Ing. Baravano & Baravano
Roma s.p.a.

lizzando un Sonicatore B Braun) in una matrice proteica tamponata contenente inibitori delle proteasi (extraction buffer). L'omogenato così ottenuto è stato sottoposto a centrifugazione (10000 g per 20 minuti) e il sopranatante impiegato per la determinazione dei livelli di NGF mediante tecnica immunoenzimatica (ELISA). La tecnica adottata è estremamente sensibile e specifica per il NGF, ed è in grado di misurare concentrazioni fino a 5 pg/ml. Come primo anticorpo è stato usato un policlonale di capra anti-NGF diluito in tampone carbonato 0,05 M a pH 9,6. Come controllo, per valutare il segnale aspecifico, sono state usate immunoglobuline purificate di capra.

Le soluzioni con l'anticorpo primario e con le immunoglobuline di controllo sono state distribuite in piastre di polistirene a 96 pozzetti in righe parallele. Le piastre sono state poi incubate per 12 ore a temperatura ambiente, e successivamente sono stati bloccati i siti aspecifici con una soluzione di tampone carbonato + BSA all'1%. Dopo il lavaggio delle piastre con una soluzione di Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, con NaCl 200 mM, 0,5% di gelatina e 0,1% di Triton X-100, i campioni e le soluzioni standard di NGF sono stati opportunamente diluiti con una soluzione di Tris-HCl 100 mM a pH 7,2, con NaCl 400 mM, EDTA 4 mM, PMSE 0,2 mM, cloruro di benzetonio 0,2 mM, benzimidina 2 mM, 40 U/ml di aprotinina, 0,05% di sodio azide, 2% di BSA e 0,5% di gelatina. Dopo aver distribuito in triplicato 50 µl/pozzetto di soluzioni standard di NGF ed i campioni, le piastre sono state incubate con l'anticorpo secondario: 4 mU/pozzetto di anti-β-NGF-galattosidasi (Boehringer Mannheim, Germania) per 2 ore a 37°C. Successivamente, dopo i lavaggi,

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

sono stati distribuiti 100 µl/pozzetto di una soluzione di 4 mg di β-galattosil-rosso di clorofenolo (Boehringer Mannheim, Germania) per ml di una soluzione di HEPES 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ mM, 0,1% di sodio azide e 1% di BSA.

Dopo aver incubato il cromogeno per due ore a 37°C la densità ottica è stata misurata a 575 nm con un ELISA reader (Dynatech). I

valori delle concentrazioni degli standard di NGF e dei campioni sono stati calcolati dopo aver sottratto i valori di fondo (background) dovuti ai legami aspecifici. I dati sono stati espressi come pg/ml o come pg/gr di tessuto pesato a fresco. I risultati, sintetizzati nella seguente Tabella 1, dimostrano come vi sia un aumento dei livelli di NGF in tutti i tessuti intraoculari 1 ora dopo la somministrazione del collirio, come tali livelli rimangano elevati, anche se ridotti, 2 ore dopo, e come essi ritornino ai livelli basali 8 ore dopo.

TABELLA 1

Livelli di NGF nei vari tessuti oculari dopo somministrazione di NGF in collirio (pg di NGF/g di tessuto)

ORE	sclera	coroide	retina	nervo ottico	cristallino	vitreo
0	100 ± 50	960 ± 400	83 ± 50	83 ± 50	100 ± 15	10 ± 4
1	1414 ± 30	2800 ± 700	484 ± 70	1195 ± 180	200 ± 30	73 ± 12
2	694 ± 150	1813 ± 900	322 ± 100	342 ± 115	150 ± 20	20 ± 5
3	200 ± 100	100 ± 500	150 ± 70	130 ± 100	110 ± 20	10 ± 5

Studi dell'effetto del NGF in collirio nelle patologie sclerali

Attualmente non vi sono terapie mediche efficaci nell'indurre

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

una riparazione di lesioni sclerali sia di natura traumatica che immunitaria o infettiva. In caso di patologie autoimmuni si assiste alla formazione di aree sclerali malaciche (scleromalacia) che tendono ad estendersi ed approfondirsi progressivamente fino alla possibile perforazione del bulbo. L'unico trattamento applicabile è quello chirurgico, consistente in un intervento di ricoprimento della zona lesa o malacica con sclera

umana conservata, oppure con altri materiali biocompatibili. Tuttavia, in caso di patologie immunitarie si assiste spesso a recidive della patologia sclerale.

Negli studi connessi all'invenzione è stato valutato l'effetto del NGF murino (2,5S) per somministrazione esterna in collirio, ad una concentrazione di 250 µg/ml diluito in soluzione salina bilanciata, in 4 casi di lesione sclerale, di cui 2 in seguito a trauma e 2 con scleromalacia per malattie autoimmuni (rispettivamente, artrite reumatoide, AR, e lupus eritematoso sistemico, LES). Il protocollo terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce della preparazione con una frequenza giornaliera così suddivisa: ogni due ore per i primi due giorni, 6 volte al giorno fino al 2° giorno dopo la riparazione completa della sclera e 4 volte al giorno per i successivi 15 giorni. La terapia, una volta sospesa, dovrebbe essere immediatamente reinstaurata nel caso in cui si verificano i primi segni o sintomi di una recidiva della patologia sclerale.

Tutti i pazienti trattati hanno mostrato chiari segni di guarigione entro 2 settimane dall'inizio del trattamento con NGF. Nessuno di essi ha mostrato la comparsa di effetti collaterali locali o sistemici durante il

Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.

trattamento o nel periodo successivo. I dati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella.



Tabella 2

Effetto del trattamento con NGF in collirio nelle patologie sclerali

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Insorgenza	Estensione	Trattamento Con NGF	Esito	Follow up
1	Trauma perforante	35, F	4 giorni	4 mm	21 giorni	guarigione	8 mesi
2	Trauma perforante	42, M	5 giorni	6 mm	25 giorni	guarigione	6 mesi
3	Scleromalacia in AR	55, F	30 giorni	5 mm	20 giorni	guarigione	10 mesi
4	Scleromalacia in LES	42, F	25 giorni	4 mm	17 giorni	guarigione	8 mesi

Studi sull'effetto del NGF in collirio sulla produzione di umore acqueo

L'effetto della somministrazione topica di NGF in termini di produzione di umore acqueo è stato valutato in prima fase in un campione di 6 conigli normotesi. Utilizzando come metodica la tonografia mediante una sonda in camera anteriore, che è in grado di valutare modificazioni nella produzione di umore acqueo, si è rilevato che la somministrazione ogni 2 ore di NGF in collirio ad una concentrazione pari a circa 200 µg/ml, diluito in soluzione salina bilanciata, induce un aumento da 3 a 5 volte della produzione di umore acqueo. Tale aumento si mantiene per tutta la durata del trattamento.

Sulla base dei dati ottenuti sul modello animale sono stati trattati 3 pazienti con marcato ipotono oculare, in due casi conseguente ad intervento chirurgico (2 occhi) e nel terzo ad uveiti croniche recidivanti. Dati i valori endooculari estremamente ridotti (< 4mmHg), le condizioni stavano rapidamente progredendo verso la tisi del bulbo. Il protocollo

*Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.*

terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce della preparazione di NGF (200 µg/ml) in soluzione salina bilanciata ogni due ore fino alla risoluzione del quadro clinico.

Tutti i pazienti trattati hanno mostrato chiari segni di guarigione entro 2 settimane dall'inizio del trattamento con NGF, con un ritorno a valori di pressione endoculare compresi tra 8 e 12 mmHg entro 4 settimane. Nessun paziente ha mostrato la comparsa di effetti collaterali locali o sistemici durante il trattamento o nel periodo successivo. I dati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella 3
Effetto della somministrazione di NGF in collirio sulla produzione di umore acqueo

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Insorgenza	Trattamento Con NGF	Esito	Follow up
1	Vitrectomia	40, M	30 giorni	23 giorni	9 mmHg	7 mesi
2	Vitrectomia	53, F	25 giorni	21 giorni	10 mmHg	11 mesi
3	Uveite cronica	45, F	40 giorni	24 giorni	12 mmHg	10 mesi

Studi sull'effetto del NGF in collirio nella prevenzione della cataratta

Avendo accertato che le cellule della capsula del cristallino esprimono il recettore ad alta affinità per il NGF e che allo stesso tempo producono questa neurotrofina, si è investigato se una variazione dei livelli locali di NGF potesse essere alla base della formazione di opacità del cristallino (cataratta, un processo collegato in genere a fenomeni della senescenza, a diabete, trattamenti con steroidi, traumi o insulti fisici) e se fosse possibile prevenirla la formazione o la progressione mediante somministrazione topica di NGF.

Ing. Barriani G. Barriani
Roma spa

Per dimostrare l'attività del NGF è stato utilizzato in primo luogo un modello di formazione della cataratta in vitro. Nello studio, 18 cristallini di ratti adulti sono stati prelevati e posti in un terreno contenente xilosio. Quindi, 6 cristallini sono stati trattati aggiungendo al terreno di coltura quantità di NGF murino variabili tra 1 e 300 pg/ml, per 6 cristallini si è aggiunta una quantità di anticorpo anti-NGF compresa tra 500 e 1000 µg/ml, e gli ultimi 6 venivano lasciati come controllo. Dopo 48 ore in coltura era evidente che i 6 cristallini in cui era stato aggiunto l'anticorpo anti-NGF presentavano una cataratta pressoché totale, mentre i 6 cristallini di controllo presentavano una cataratta corticale con scarso interessamento del nucleo del cristallino. Gli ultimi 6, con aggiunta di NGF, presentavano soltanto rare tracce di opacità, la risposta migliore essendo ottenuta per una concentrazione di NGF nel mezzo di coltura di 200 pg/ml circa.

Per avere una conferma in vivo sull'attività del NGF nel prevenire l'insorgenza della cataratta, è stato utilizzato un modello animale di catarattogenesi mediante una dieta al 30% di glicerolo. Il 100% degli animali sottoposti a questo tipo di dieta sviluppa una cataratta entro il 44° giorno. Un gruppo di 10 animali è stato trattato con tre somministrazioni giornaliere di NGF in collirio ad una concentrazione di 200 µg/ml diluito in soluzione salina bilanciata, un altro gruppo di 10 animali è stato sottoposto a trattamento con anticorpi anti-NGF iniettati in camera anteriore e l'ultimo gruppo di animali è stato trattato con soluzione salina in gocce ed utilizzato come controllo.

Nel gruppo di animali trattati con anticorpo anti-NGF tutti i ratti

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

hanno sviluppato una cataratta entro il 30° giorno dall'inizio dell'esperimento; nel gruppo trattato con soluzione salina tutti gli animali hanno sviluppato una cataratta entro il 45° giorno, mentre nel gruppo di animali trattati con NGF solo 2 ratti (20%) hanno sviluppato una cataratta entro il 45° giorno.

Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie retiniche

Per valutare l'efficacia della somministrazione del NGF sulla superficie oculare nelle patologie retiniche sono stati ripetuti, in una prima fase, gli esperimenti su modelli animali già riportati in letteratura, utilizzando, oltre alle somministrazioni intravitreali o retrobulbari già descritte, anche la somministrazione del NGF in collirio, ogni 2 ore, alla concentrazione di 250 µg/ml in soluzione salina bilanciata. In tutti gli esperimenti, sia nel danno ischemico retinico, che nel danno da ipertensione oculare, che nella retinite pigmentosa, il NGF somministrato in collirio ha dimostrato una efficacia pari alle altre vie di somministrazione.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'animale sono stati trattati un totale di 7 pazienti, di cui 3 affetti da retinite pigmentosa, 1 affetto da foro maculare, 2 da maculopatia atrofica senile e 1 da retinopia miopica. Il protocollo terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce di NGF in collirio ad una concentrazione di 250 µg/ml in soluzione salina bilanciata ogni due ore per 4 settimane. I risultati del trattamento sono stati valutati in termini di esame obiettivo, elettroretinogramma (ERG), flusso ematico dell'arteria centrale retinica (valutato mediante OBF), sensibilità al contrasto, spessore dello strato delle fibre nervose (valutate con l'OCT), microperimetria e visus.

Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.

Dopo 4 settimane di trattamento tutti i parametri considerati sono risultati considerevolmente migliorati; in particolare si è avuto un miglioramento dell'ERG, del flusso ematico, della sensibilità al contrasto, un aumento delle fibre nervose, della microperimetria e un incremento del visus. I dati ottenuti sono riassunti nella seguente Tabella 4.

(segue tabella)



Ing. Parrino & Parrino
Roma spa

Tabella 4
Effetto del trattamento con NGF in collirio in patologie retiniche

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Tipo di Trattamento	Trattamento Con NGF	ERG ¹⁾	OB ²⁾	Sensibilità al Contrasto	OCT ³⁾	Microperimetria	Visus
1	Retinite pigmentosa	35, F	Collirio	4 settimane	++	+	++	+	+	++
2	Retinite pigmentosa	40, F	Collirio	4 settimane	++	+/-	++	+	+	++
3	Retinite pigmentosa	32, M	Collirio	4 settimane	+++	++	++	+	++	+++
4	Foro maculare	55, F	Collirio	4 settimane	+	+	+	+++	+++	+++
5	Degenerazione maculare senile	70, F	Collirio	4 settimane	+	+/-	+	++	+++	+++
6	Degenerazione maculare senile	73, M	Collirio	4 settimane	+/-	+/-	+	++	++	+
7	Retinopatia miopica	26, M	Collirio	4 settimane	+	+	+	++	+++	+++

I valori sono espressi come miglioramento rispetto ai valori prima del trattamento con NGF: "+" = stabile o peggioramento; "+/-" = miglioramento < 10%; "++" = miglioramento tra l'11% e il 25%; "+++" = miglioramento tra il 26% e il 50%; "++++" = miglioramento tra il 51% e il 75%; "+++++" = miglioramento superiore al 75% = miglioramento tra l'11% e il 25%; "+++" = miglioramento tra il 26% e il 50%; "++++" = miglioramento superiore al 75%
¹⁾ ERG = elettroretinogramma; ²⁾ OB = flusso ematico dell'arteria centrale retinica; ³⁾ OCT = spessore dello strato di fibre nervose

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie del nervo ottico

Per valutare l'efficacia della somministrazione del NGF sulla superficie oculare nelle patologie retiniche sono stati ripetuti, in una prima fase, gli esperimenti su modelli animali già riportati in letteratura, utilizzando, oltre alle somministrazioni intravitreali o retrobulbari già descritte, anche la somministrazione del NGF in collirio, ogni 2 ore, alla concentrazione di 250 µg/ml in soluzione salina bilanciata. In tutti gli esperimenti di crash e sofferenza ischemica del nervo ottico il NGF somministrato in collirio ha dimostrato una efficacia pari alle altre vie di somministrazione.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'animale sono stati trattati un totale di 7 pazienti, di cui 3 affetti da glaucoma a bassa pressione, 2 affetti da neurite retrobulbare idiopatica e 2 da neurite ottica ischemica. Il protocollo terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce di NGF in collirio ad una concentrazione di 200 µg/ml in soluzione salina bilanciata ogni due ore per 4 settimane. I risultati del trattamento sono stati valutati in termini di esame obiettivo, potenziali evocati visivi (PEV), flusso ematico dell'arteria centrale retinica (valutato mediante OBF), sensibilità al contrasto, spessore dello strato delle fibre nervose (valutate con l'OCT), microperimetria, campo visivo e visus.

Dopo 4 settimane di trattamento tutti i parametri considerati sono risultati considerevolmente migliorati; in particolare si è avuto un miglioramento dei PEV, del flusso ematico, della sensibilità al contrasto, un aumento delle fibre nervose, della microperimetria, del campo visivo e un incremento del visus. I dati ottenuti sono riassunti nella seguente Tabella 5.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Tabella 5
Effetto del trattamento con NGF in collirio nelle patologie del nervo ottico

n. Paziente	Patologia	Età (anni) Sesso	Trattamento con NGF	PEV ¹⁾	OB ²⁾	Sensibilità al Contrasto	OCT ³⁾	Microperimetria	Campo visivo	Visus
1	Glaucoma a pressione normale	45, F	4 settimane	+++	++	++	++	++	++	++
2	Glaucoma a pressione normale	37, F	4 settimane	++	+	+	++	++	+	+
3	Glaucoma a pressione normale	42, M	4 settimane	+	++	+	++	++	++	++
4	Neurite ottica idiopatica	41, M	4 settimane	++	++	+	+	++	+	++
5	Neurite ottica idiopatica	38, F	4 settimane	++	++	+	+/-	+	+/-	+
6	Neurite ottica ischemica	52, F	4 settimane	++	++	++	+	+/-	+	++
7	Neurite ottica ischemica	58, F	4 settimane	++	++	+	++	++	+	++

I valori sono espressi come miglioramento rispetto ai valori prima del trattamento con NGF: "+" = stabile o peggioramento; "+/-" = miglioramento < 19%; "++" = miglioramento tra l'11% e il 25%; "+++" = miglioramento tra il 26% e il 50%; "++++" = miglioramento tra il 51% e il 75%; "+++++" = miglioramento superiore al 75%.

¹⁾ PEV = elettroretinogramma; ²⁾ OB = flusso ematico dell'arteria centrale retinica; ³⁾ OCT = spessore dello strato di fibre nervose

Ing. Parravano & Parravano
Roma s.p.a.

Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie vitreali

Una soluzione salina bilanciata contenente 250 µg/ml di NGF è stata somministrata tre volte al giorno per 4 settimane in 4 pazienti affetti da miodesopsie dovute alla presenza di corpi mobili vitreali. Dopo 4 settimane di trattamento tutti e 4 i pazienti hanno riferito un miglioramento della sintomatologia.

Studi sull'effetto del NGF in collirio nelle patologie coroidali

Per valutare l'effetto della somministrazione oftalmica esterna di NGF nelle patologie della coroide è stato utilizzato un modello animale di uveite autoimmune, ottenuta mediante somministrazione di antigene retinico S nei ratti. Un gruppo di animali è stato trattato ogni due ore con una goccia di NGF in collirio ad una concentrazione di 200 µg/ml diluito in soluzione salina bilanciata. Dopo 4 settimane di trattamento le lesioni presenti a livello uveo-retinico negli animali trattati con NGF in collirio sono state confrontate con quelle presenti negli animali trattati con soluzione salina. In tutti gli animali trattati con NGF era evidente una riduzione delle lesioni tissutali.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Banchetti
(N° d'iscr. 463)

Marina Banchetti



Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

RIVENDICAZIONI

1. Uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per somministrazione sulla superficie oculare, per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico dei tessuti intraoculari.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto preparato oftalmico è in forma di soluzione o di sospensione (collirio), di unguento,

di gel o di pomata con un veicolo oftalmico farmaceuticamente accettabile, oppure in forma di inserto oculare erodibile o di sistema "reservoir" a membrana polimerica da disporre nel sacco congiuntivale, oppure è aggiunto ad un bendaggio locale con lente a contatto terapeutica.

3. Uso secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui detto preparato oftalmico è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie della sclera, dei corpi ciliari, del cristallino, della retina, del nervo ottico, del vitreo e della coroide.

4. Uso secondo la rivendicazione 3, in cui dette patologie sono patologie su base trofica, post-traumatica, infettiva, post-chirurgica, autoimmune, distrofica, degenerativa, post-infiammatoria e conseguente a trattamento laser.

5. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-4, in cui detto preparato oftalmico contiene da 1 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ di NGF.

6. Uso secondo la rivendicazione 5, in cui detto preparato oftalmico è in forma di collirio e contiene da 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$ di NGF.

7. Uso secondo la rivendicazione 6, in cui detto collirio contiene 200-250 $\mu\text{g/ml}$ di NGF.

8. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-7, in cui il NGF è

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

in associazione, in detto preparato oftalmico, con uno o più altri principi attivi e/o è coniugato con una molecola carrier.

9. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui detto NGF è di origine murina o umana, o è NGF umano ricombinante.

10. Uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un preparato oftalmico per la terapia e/o la profilassi di patologie a carico

dei tessuti intraoculari, ad esclusione delle patologie retiniche e del nervo ottico.

11. Uso secondo la rivendicazione 10, in cui detto preparato oftalmico è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie della sclera, dei corpi ciliari, del cristallino, del vitreo e della coroide.

12. Uso secondo la rivendicazione 11, in cui dette patologie sono patologie su base trofica, post-traumatica, infettiva, post-chirurgica, autoimmune, distrofica, degenerativa, post-infiammatoria e conseguente a trattamento laser.

13. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-4, in cui detto preparato oftalmico contiene da 1 a 1000 µg/ml di NGF.

14. Uso del nerve growth factor nella terapia di patologie a carico dei tessuti intraoculari secondo le rivendicazioni 1-13, sostanzialmente come sopra descritto.

ROMA, 29 GEN. 1999

p.p. Alessandro LAMBIASE

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Bonchetti
(N. d'isr. 463)

Marina Bonchetti



*Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.*

MB

ABSTRACT OF THE INVENTION WITH MAIN DRAWING, DESCRIPTION AND CLAIM

APPLI CATION NUMBER **RM99 A000069**

FILING DATE **29/01/1999**

PATENT NUMBER

GRANT DATE

D. TITLE

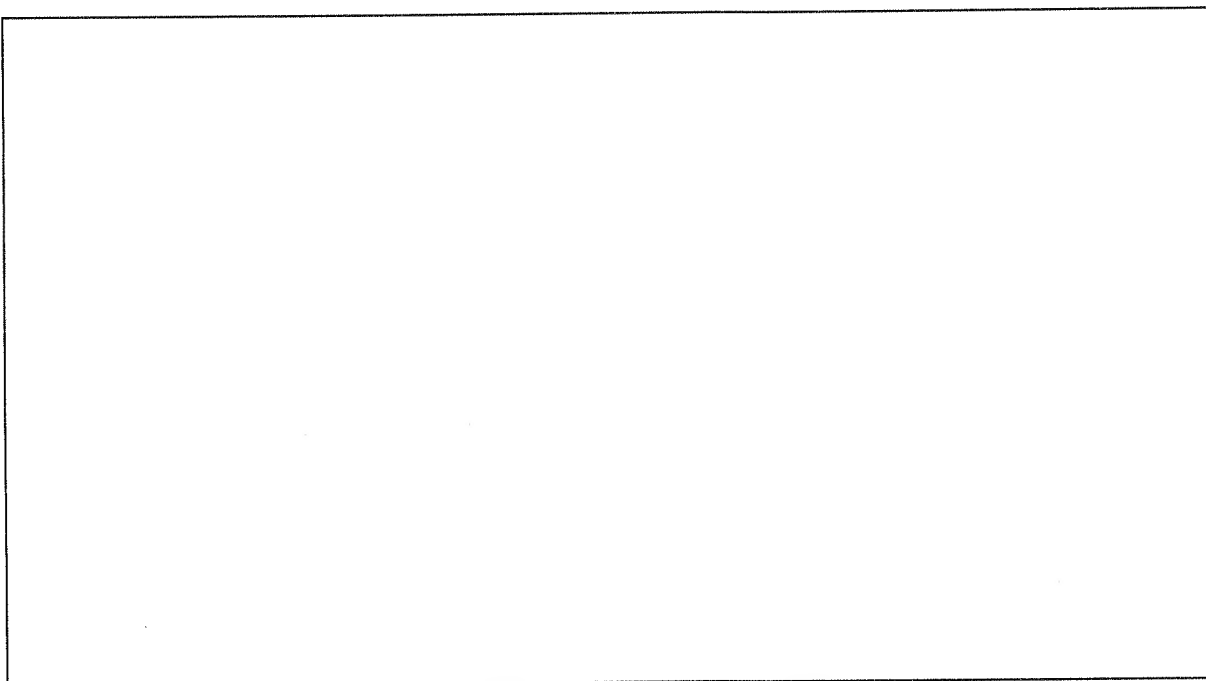
"Use of Nerve Growth Factor for therapy of intraocular tissue pathologies"

In the name of: LAMBIASE Alessandro

L. ABSTRACT

Nerve Growth Factor (NGF), in the form of a preparation to be administered over ocular surface, is proposed as being suitable for therapy and/or prophylaxis of intraocular tissue pathologies, with particular reference to sclera, ciliary body, crystalline lens, retina, optic nerve, vitreous body and choroidea affections. When administered in the form of external ophthalmic preparation, for example as collyrium or ointment, NGF is capable to go through ocular tissues, and it has been found out that it shows a therapeutic activity not only against retina and optic nerve pathologies but also against affections involving the above reported internal structures of the eye

M. DRAWING



SPECIFICATION

accompanying an application for patent for invention having the title:

“Use of nerve growth factor for the therapy of intraocular tissue pathologies”

in the name of: Alessandro LAMBIASE

Inventor: The same Applicant

The present invention relates to the use of nerve growth factor for the therapy of intraocular tissue pathologies. More particularly, the invention relates to the use of the neurotrophin, named nerve growth factor (NGF), for the therapeutic treatment of the eye internal structures, as sclera, choroidea, ciliary bodies, crystalline lens, vitreous body, retina and optic nerve, by a topical administration over the ocular surface, i.e. as collyrium or ophthalmic ointment.

As it is known, the nerve growth factor (NGF) is the chief molecule of a complex neurotrophin family, and is well known for its trophic, tropic and differentiating activity on cholinergic neurons of the central nervous system and on the sympathetic peripheral system. NGF is produced by various mammalian tissues, included humans, and is released in the blood stream in greater amounts during the growth and differentiation of the nervous system. Biological, biochemical and molecular studies carried out on *in vitro* cellular systems have pointed out high sequence homology between murine and human NGF. Furthermore, in humans and other mammals NGF is normal-

ly contained both in the cerebrospinalis liquor and blood stream at concentrations of about 10-15 pg/ml. The value increases during some inflammatory pathologies (autoimmune and allergic diseases, etc.), whereas it decreases in others (diabetes).

NGF has been discovered by Prof. Rita Levi-Montalcini, at the Zoology Institute of the Washington University of St. Louis (Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, 1966), and its discovery represented a remarkable advance in the study of the growth and differentiation mechanisms of the nerve cell, as NGF is able to affect the development and preservation of the biological functions of the neurons and their regeneration. In 1986 the Nobel Prize for Medicine and Physiology was awarded to Prof. R. Levi-Montalcini for the discovery of this molecule and the characterization of its biological function both in peripheral and in central nervous system.

Various experimental studies both *in vitro* and *in vivo* have demonstrated the physiopathological importance of NGF in preventing neuronal injury of surgical, chemical, mechanical and ischemic origin, thereby making it the ideal candidate for use in the therapy of various pathologies affecting both the peripheral and central nervous systems (Hefti F., J. Neurobiol., 25:1418, 1994; J. Fricker, Lancet, 349:480, 1997). In fact since some years ago clinical tests are being carried out on subjects affected by Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease by intracerebral administration of murine NGF (see, for example, Olson L. et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4:79, 1992). Results of these experiments confirmed

the observations obtained from animal models and pointed out the absence of possible side effects following the administration of murine NGF. This behaviour has been confirmed more recently for recombinant human NGF (Petty B.G. et al., *Annals of Neurobiology*, 36:244-246, 1994).

Studies on the characterization of biological, biochemical, molecular, pre-clinical and clinical effects of NGF almost exclusively have been carried out using NGF isolated from submandibular glands of adult rodents; therefore available data concern mostly murine NGF. The biochemical properties of the latter, particularly, have been described in a study published in 1968 (Levi-Montalcini R. and Angeletti P.U., *Physiological Reviews*, 48:534, 1968).

The NGF contained in murine salivary glands is a 140 kdalton molecular complex, the sedimentation coefficient thereof being 7S, and it is constituted by three sub-units, α , β and γ , the second one of which represents the actual active form. The latter, called β NGF, whose sedimentation coefficient is 2.5S, is usually extracted and purified according to three not very different techniques (Bocchini V., Angeletti P.U., *Biochemistry*, 64:787-793, 1969; Varon S. et al., *Methods in Neurochemistry*, 203-229, 1972; Mobley W.C. et al., *Molecular Brain Research*, 387:53-62, 1986).

The so obtained β NGF is a dimer of about 13.000 dalton, consisting of two identical chains of 118 amino acids. Each chain is stabilised by three disulphide bridges, while non-covalent bonds assure the stabilisation of the dimeric structure. The molecule is very stable and is soluble in almost all

solvents, both aqueous and oily, maintaining unchanged its biochemical characteristics and biological activity. Further details about the structure, physical and biochemical properties of the molecule are reported in Green, L.A. and Shooter, E.M., *Ann. Rev. Neurosci.*, 3:353, 1980.

Recently the structure of β NGF has been further disclosed by means of crystallographic analysis. The analysis pointed out the presence of three anti-parallel filament pairs, having a β -type secondary structure, forming a flat surface along which the two chains join together resulting in the active dimer. On these β NGF chains the presence of four "loop" regions has been showed, wherein many variable amino acids are included. These variable amino acids are probably responsible for receptor recognition specificity.

The biological effect of NGF is mediated by two receptors present on the surface of the corresponding target cells. The existence of various antibodies that selectively inhibit the NGF biological effect has allowed an accurate characterization and modulation of the activity thereof, both in cellular systems and *in vivo*.

More recently human NGF has been synthesized using genetic engineering techniques (Iwane et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171:116, 1990) and small amounts of human NGF are commercially available too. However, direct experimentation has shown that the biological activity of human NGF is very low when compared to murine NGF. Furthermore it is to be pointed out that almost all of data available concerning human NGF, both *in vivo* and *in vitro*, have been obtained using murine NGF and no un-

desirable side-effects resulting from the murine origin of the molecule have ever been detected.

Studies carried out on animal models starting in the 90's suggested a possible involvement of NGF in ocular pathologies. Apart of some patent publications wherein NGF is not the object of actual experimental results, but is only mentioned together with other known growth factors (on the basis of the unverified assumption that it belongs to a homogeneous class of molecules having equivalent characteristics and biological activities), and apart of the PCT patent application No. WO98/48002, in the Applicant's name, wherein the use of NGF in the therapy for cornea and conjunctiva pathologies is proposed (as discussed in detail below), the scientific reports published in the ophthalmic field exclusively refer to the use of NGF for retina and optic nerve affections.

In particular, it has been reported that the intraocular administration of NGF to animal models is effective in enhancing the survival of retinal ganglion cells following acute retinal ischemia (Siliprandi R. et al., *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34:3232, 1993) and following optic nerve transection (Carmignoto G. et al., *J. Neurosci.*, 9:1263, 1989). More recently, the NGF administration by intravitreous or also retrobulbar injection proved to be effective in a mouse retinal degeneration model, which is similar to human retinitis pigmentosa (Lambiase A. and Aloe L., *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 234:S96-S100, 1996), and in a rabbit retinal damage model resulting from ocular hypertension (Lambiase A. et al., *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*

mol., 235:780-785, 1997).

Such experimental studies showed that the local administration of NGF is effective for preventing or at least delaying the death of retinal ganglion cells and photoreceptors resulting from the above pathologies. In addition no side effects during the animal treatments have been reported. However, it is to be pointed out that in all the scientific publications referred to above, NGF is administered to the internal ocular tissue by intra-vitreous injection or by retrobulbar injection.

The PCT patent application WO 98/48002 referred to above appears to be up to now the only document wherein the use of NGF as external ophthalmic application, for example in the form of collyrium or ointment, is described. The experimental work reported therein proves that topically administered NGF is suitable for a successful treatment of ocular surface pathologies (i.e., affecting cornea and conjunctiva) both of acquired and congenital type and, particularly, of various dystrophic or neurodystrophic pathologies for which therapeutic treatments did not exist previously. The discovery of the presence of NGF and of its high affinity receptor (TrkA, tyrosine kinase A) in corneal tissue, made by immunohistochemical techniques, was the preliminary step for such innovative result. Clearly, the expression of the high affinity receptor for NGF is an essential prerequisite for this factor to exert its therapeutic activity.

In the frame of the studies which led to the present invention it has been found, by both immunohistochemical and immunofluorescence tech-

niques (Lambiase et al., J. Allergy Clin. Immunol., 100:408-414, 1997) and, in addition, by biomolecular techniques for the *in situ* identification of the NGF mRNA (Micera A. et al., Archives Italiennes de Biologie, 133:131-142, 1995), that all cells of the sclera, crystalline anterior capsule, ciliary body epithelium, the optic nerve fibers, the retinal ganglion cells, the retinal pigmented epithelium cells and some choroidea cells not only express the high affinity receptor for NGF but are also able to produce this neurotrophin (not yet published data). These experimental data result in various implications. On the one hand NGF, released from cells of various ocular tissues, should exhibit a trophic and physiopathological activity in all the ocular regenerative mechanisms; on the other hand, various pathologies of trophic, degenerative or immune type should recognise the failed release of NGF as a fundamental etiologic step.

Furthermore, as the effects observed after the administration of exogenous NGF are present at almost physiological concentrations (in the order of about a few micrograms), it is conceivable that in some ocular affections the reduction of local NGF levels under the threshold value suitable to assure the tissue integrity can be a possible physiopathogenetic mechanism. Such a pathogenetic hypothesis is confirmed by some published data concerning the effects of NGF deprivation. The latter induces, both *in vitro* and *in vivo*, the death of various cell populations and the exacerbation of tissue damages of chemical, physical, infective or degenerative type (Aloe L., Int. J. Devl. Neuroscience, volume 5(4), 1987; Lambiase A. and Aloe L., cited

above; Lambiase et al., Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1997, cited above).

In view of the foregoing, although the above results allow to hypothesise a therapeutic activity of NGF also on ocular structures and tissues different from those already reported in the literature, and specifically on sclera, ciliary bodies, crystalline, vitreous body and choroidea, there is the problem of an easy administration of the active principle to the involved tissues. Contrary to the case considered in the PCT patent application WO 98/48002, referring to corneal and conjunctival pathologies, in this case tissues within the eyeball are involved.

The possibility of administering an ophthalmic therapeutic agent by the external ophthalmic route, i.e. in the form of collyrium or ointment, represents a remarkable benefit in comparison with the administration through the topical parenteral route, e.g. by retrobulbar or intravitreal injection. In fact the use of these latter techniques involves the risk for various complications, reported in literature, such as the ocular bulb perforation, infections, haemorrhages and lesions of anatomical structures during injection. Such complications can occur even more frequently during the treatment of chronic pathologies, and can lead to the unfeasibility of the therapy due to the inversion of the risk/benefit ratio.

It has now surprisingly been found that by administering NGF in the form of collyrium, an increase of the neurotrophin levels in all ocular tissues, including those internal to the ocular bulb, is obtained. As it will be illustrated

in detail in the following experimental report, the passage of NGF from the ocular surface, where it is administered, to internal ocular tissues, has been shown using both an autoradiographic method (Levi-Montalcini, R. and Aloe L., Proc. Natl. Sci. USA 82:7111-7115, 1985), and an immunoenzymatic assay (Bracci-Laudiero, L. et al., Neurosci. Lett., 147:9-12, 1992). The application of the latter method on rabbits treated by conjunctival instillation of a NGF-containing saline solution has caused, one hour after the administration, an increase of NGF concentration in all the examined ocular tissues. The NGF level is reduced to initial levels after 6-8 hours. This effect allows NGF to perform its therapeutic activity also in tissues not directly involved by a superficial administration. This aspect is innovative not only with reference to the ophthalmic pathologies for which till now the NGF therapeutic activity had not even been hypothesized, but also for the retinal and optic nerve pathologies, wherein the potential activity of NGF has been already reported, but it was not possible to administer the drug in a ready and safe way without risks and drawbacks for the patient.

Accordingly, the present invention specifically provides the use of nerve growth factor (NGF) for the production of an ophthalmic preparation for administration over the ocular surface for the therapy and/or the prophylaxis of intraocular tissue pathologies. Specifically, said NGF-containing ophthalmic preparation is in the form of a solution or a suspension (collyrium), an ointment, a gel or a cream in a pharmaceutically acceptable carrier, which is tolerated by the eye and compatible with the active principle. It is also possi-

ble to conceive particular routes for ophthalmic administration for delayed release, as ocular erodible inserts, or polymeric membrane “reservoir” systems to be located in the conjunctiva sac. Alternatively NGF, or a preparation containing it, can be added to a local bandage together with a therapeutic contact lens.

As already pointed out, said ophthalmic preparation is suitable for the therapy and/or the prophylaxis of pathologies affecting the sclera, ciliary bodies, crystalline lens, retina, optic nerve, vitreous body and choroidea, said affections having trophic, post-traumatic, infective, post-surgical, autoimmune, dystrophic, degenerative or post-inflammatory origin, or being originated by laser treatment. As it will be confirmed by the experimental data reported below, the external topical administration of NGF proved, among other things, to be able to repair scleral lesions of traumatic or immune origin, to cause an increase of aqueous humour production, restoring the intraocular pressure in pathologies characterised by hypotonia and resulting in bulbar phthisis, and to prevent and delay the formation and progression of crystalline lens opacity (cataract). As to the retinal pathologies, the NGF administration by application over the ocular surface induces an increase of nervous fiber thickness, a survival of retinal ganglion cells, photoreceptors, and pigmented epithelium during degenerative, ischemic, traumatic pathologies and when damages from ocular hypertonia are present. As to the optic nerve, the effects obtained are an improvement of visual evoked potentials (VEP), of visual field and of the survival of nervous fibers when traumatic, ischemic,

pressor and degenerative pathologies occur. Finally, as to choroidea the NGF administration by external ophthalmic application causes a reduction of choroidea inflammatory processes and reduces the number of mobile vitreous bodies. It is to be pointed out that many of these disorders are hardly therapeutically treated, or they lack any effective treatment.

The possibility that nerve growth factor could exhibit a biological activity on internal tissues of the ocular bulb following an external local administration was hardly predictable mainly considering that, as pointed out before, NGF is a quite big molecule (26,800 dalton) with a complex structure. In order that an exogenous molecule can exert its activity on deep ocular tissues, it is necessary that, once it has been instilled over the eye surface, the molecule pass through the lacrimal layer, the cornea, the aqueous humour and the vitreous body so to be distributed within all the tissues. According to the current practice no molecules (particularly antibiotics or cortisone molecules) which are able to reach the crystalline lens, vitreous body and retina at therapeutically effective concentrations are presently available. For the above reasons in all the known studies on the utilisation of NGF for ocular pathologies, only the intraocular administration route was used.

In effect NGF, although having a complex structure and high molecular weight, includes both hydrophilic and hydrophobic groups which allow it to pass through both lipid and hydrophilic anatomical barriers. Furthermore it is a basic characteristic of NGF that once it has reached the target organs, also at very low but yet biologically active concentrations, it is able to stimulate

tissue to produce endogenously the NGF. The presence of an endogenous fraction of NGF is clearly suggested by experimental results on the passage of NGF through tissues. These results furthermore show that a concentration gradient is not maintained from the external surface to deeper eye tissues, as it would be conceivable in the presence of a simple diffusion mechanism through the tissues.

In order to produce the preparation according to the present invention, suitable procedures for the NGF extraction and purification are reported in the previously cited references. The technique according to Bocchini and Angeletti, herein briefly reported, has been used for the experiments of the present invention. Submandibular glands of adult male mice are collected in a sterile way and tissues thereof are homogenised, centrifuged and dialysed; then the obtained suspension is passed through subsequent cellulose columns, whereon NGF is adsorbed. Then NGF is eluted with a buffer containing 0.4 M sodium chloride. The obtained samples are analysed spectrophotometrically at a 289nm wavelength to identify the NGF containing fractions. These fractions are dialysed and the NGF is lyophilised in a sterile way and stored at -20°C in freezer.

A medicament according to the invention suitable for administration over the intact ocular surface contains, alone or optionally in association with one or more other active principles, from 1 to 1000 $\mu\text{g/ml}$ of NGF. In the case the product is in the form of an aqueous solution (collyrium), the concentration of NGF is preferably between 10 and 500 $\mu\text{g/ml}$. A specific formulation

suitable in the form of collyrium may contain, for example, 200 µg/ml of NGF in physiological solution containing 0.9% of sodium chloride, or in balanced saline solution (BSS[®]); in both circumstances the solution is isotonic with the tear fluid and therefore well tolerable by the eye. However, it is also possible the use of hypotonic solutions.

The saline solutions based on NGF, either alone or in combination with other biologically active molecules, and/or conjugated with carrier molecules (as, for example, transferrin) in order to further enhance its passage through ocular surface, may also contain other excipients selected from those conventionally used according to pharmaceutical techniques, for example in order to buffer the solutions or suspensions, to stabilise the active principle and make the preparation well tolerable. Specifically, buffers should keep pH between 4 and 8. For example the above reported sodium chloride solution can be buffered using any of the buffers well known in the pharmaceutical field as suitable for ophthalmic use, among which phosphate or trizma (tri-hydroxymethyl-aminomethane) buffers, so as to have a physiological pH, i.e. 7.0-7.4, maintaining simultaneously a physiological osmolarity (295-305 mOsm/l).

The tolerability can be further enhanced using excipients like polysorbate 80 (or Tween 80), dextran, polyethylene glycol (for example PEG 400) and like. The formulation can contain also viscosity-enhancing agents like hyaluronic acid, methylcellulose, polyvinylalcohol, polyvinylpyrrolidone and others, in order to enhance the ocular bioavailability, stability and tolera-

bility of the active principle. The ocular bioavailability of NGF can be further enhanced by using compounds that ameliorate the corneal permeation of the drug as, for example, dimethylsulfoxide, taurocholates, membrane phospholipids and various surfactant agents suitable for ophthalmic use. In addition, to prevent contamination, a preservative agent having antimicrobial activity can be added to the formulation.

Agents like carboxymethylcellulose or the like can be added to products to be administered in the form of suspension. If it is desired to use the formulation in the form of ointment, gel or ophthalmic cream, the NGF carrier could be polyethyleneglycol, polyacrylate, polyethyleneoxide, fatty acid and alcohol or lanolin, paraffin and similar products.

As already pointed out, the therapeutic activity of nerve growth factor on ocular tissues other than the superficial ones (cornea and conjunctiva), and the retina and optic nerve, has not been previously disclosed, neither when it is administered by intraocular injection nor when it is administered in formulations in the form of collyrium or ointment. Therefore, the present invention further provides the use of nerve growth factor (NGF) for the production of an ophthalmic preparation for the therapy and/or prophylaxis of intraocular tissues pathologies, except retina and optic nerve pathologies, whatever the administration route is.

Also in this case the concentration of NGF in the preparation is preferably between 1 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ of NGF and all the conventional formulation procedures well known in the field can be used, particularly those pre-

viously reported with reference to the ophthalmic formulations for external administration.

Some experimental results, obtained within the frame of the present invention, including clinical data concerning therapeutic applications on humans, are reported below merely for exemplary purposes.

Studies on the passage of NGF through the ocular tissues

In a first set of tests to study the passage of NGF intraocularly from the external surface over which it was administered, the above mentioned autoradiographic method has been used for a group of six rabbits. Each of the animals was administered with one collyrium drop (50 μ l) containing 10 μ g of I^{125} labeled NGF (concentration: 200 μ g/ml) by instillation in the conjunctival fornix.

Murine NGF purified according to the previously described method and subsequently conjugated to Na- I^{125} (Amersham Italia, IMS30, 1mCi) according to the chloramine T method (Lapack PA. Exp. Neurol. 124:1620, 1993) has been used. The amount of labeled NGF has been determined by chromatography using a Sephadex G-25 column. The amount of the I^{125} labeled product collectible by precipitation was between 90% and 95%, showing that most of the radioactive product was bonded to NGF. The specific activity of NGF- I^{125} was between 1 and 1.5 Ci/ μ mol.

Two hours following the administration of the labeled NGF the animals were sacrificed and eyes enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde over 48 hours. Then samples, after incubation in 30% sucrose over 24 hours,

were cut with a cryostat to 15 μ m thick sections. Sections were mounted on histology gelatinous slides, immersed in photographic emulsion (Ilford K2) and incubated over 4 weeks at 4°C. The sections were successively dehydrated using ethanol, mounted on DPX after treatment with xylene and examined with Zeiss optical microscope.

This experiment showed that labeled NGF, after its administration over the ocular surface, was able to penetrate into the eye and bond with cells of various tissues contained in the posterior segment and crystalline lens inducing the expression of the specific receptor.

In a second set of tests, using the above described immunoenzymatic method, the quantitative levels of NGF in various ocular tissues after the administration by instillation of a drop of murine NGF in the conjunctiva fornix were determined. In all 24 rabbits were used, six thereof were sacrificed immediately to determine the baseline values of NGF concentration in various ocular tissues. Remaining animals were sacrificed after 1 (6 rabbits), 2 (6 rabbits) and 8 hours (6 rabbits) following the administration of the collyrium.

In all the cases the eyes were enucleated and the different tissues (cornea, sclera, aqueous, iris, crystalline lens, retina, choroidea, optic nerve) were sectioned. The tissues were weighed, sonicated (using Braun B Sonicator) in a buffered protein matrix containing protease inhibitors (extraction buffer). The thus obtained homogenate was centrifuged (x 10000 rpm for 20 minutes) and the supernatant was used to determine the levels on NGF by immunoenzymatic method (ELISA). This technique is extremely sensitive and

NGF specific, and it is able to detect concentrations up to 5 pg/ml. Goat anti-NGF polyclonal antibody, diluted in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6, was used as first antibody. As control, for the determination of unspecific signal, purified goat immunoglobulins were used.

Solutions containing primary antibody and control immunoglobulins were placed in parallel on polystyrene 96-well plates. Then the plates were incubated for 12 hours at room temperature and then the unspecific sites were blocked using a solution containing carbonate buffer plus 1% BSA. Further to plate washings with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.5% gelatine, and 0.1% Triton X-100, NGF samples and standard solutions were suitably diluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 400 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0.2 mM PMSE, 0.2 mM benzethonium chloride, 2 mM benzimidine, 40 U/ml aprotinin, 0.05% sodium azide, 2 % BSA and 0.5 % gelatine. After triplicate distributions of standard solutions and samples of NGF in an amount of 50 μ m/well, the plates were incubated with the secondary antibody: 4 mU/well of anti- β -galactosidase (Boehringer Mannheim, Germany) for 2 hours at 37°C. Then, after the washings, 100 μ l/well of a solution containing 4 mg of β -galactosil-chlorophenol red (Boehringer Mannheim Germany)/ml of 100 mM HEPES, 150 mM NaCl, mM $MgCl_2$, 0,1% sodium azide and 1% BSA solution were distributed.

After the incubation of the chromogen for a period of two hours at 37°C the optical density at wavelength of 575 nm was determined using an ELISA reader (Dynatech). The concentration values of NGF standards and

samples were calculated after subtraction of background values due to unspecific bonds. Data reported as pg/ml or pg/g are referred to fresh weighed tissue. The results, summarized in the following Table 1, show that: after one hour from the collyrium administration the NGF concentration values are increased in all the intraocular tissues, these values are maintained high, although reduced, after 2 hours, and after 8 hours they are again the same as the baseline ones.

TABLE 1

NGF concentrations in various ocular tissues after NGF administration in the form of collyrium (NGF pg/g of tissue)

HRS	SCLERA	CHOROIDEA	RETINA	OPTIC NERVE	CRYSTAL-LINE LENS	VITREOUS BODY
0	100 ± 50	960 ± 400	83 ± 50	83 ± 50	100 ± 15	10 ± 4
1	1414 ± 30	2800 ± 700	484 ± 70	1195 ± 180	200 ± 30	73 ± 12
2	694 ± 150	1813 ± 900	322 ± 100	342 ± 115	150 ± 20	20 ± 5
3	200 ± 100	100 ± 500	150 ± 70	130 ± 100	110 ± 20	10 ± 5

Studies on the effect of NGF administration in the form of collyrium for scleral pathologies

Presently no therapeutic treatments effective to induce reparations for both traumatic and immune or infective scleral lesions are known. In the case of autoimmune pathologies the formation of malacic sclera zones (scleromalacia) occurs which tend progressively to enlarge and become deeper with possible bulb perforation. Surgical treatment is the unique usable thera-

py and it includes the coating of damaged or malacic zone with a layer of human stored sclera or other biocompatible human tissues. However, in the case of immune affections, recidivations of the scleral pathology often occur.

In the studies in connection with the present invention the effect of external administration in the form of collyrium of murine NGF (2.5S), at a concentration of 250 µg/ml in balanced saline solution, was evaluated for 4 cases of scleral lesions, 2 of which post-traumatic and 2 scleromalacic due to autoimmune diseases (reumatoid arthritis, AR and systemic lupus erythematosus, respectively). Therapeutic protocol included the daily instillation of one or two drops of preparation in the following way: during the first two days every two hours, six times a day up to the second day from the complete sclera reparation and four times a day during the following fifteen days. The therapy, once interrupted, should be immediately restarted if initial signals or symptoms of recidivations of scleral pathology are present.

All the patients within two weeks from the beginning of the treatment with NGF showed clear signals of recovery. None thereof showed occurrence of local or systemic side effects during or after the treatment. Obtained data are summarised in the following table.

(table follows)

TABLE 2
Effect of treatment with NGF in the form of collyrium for scleral pathologies

Pat. No.	Pathology	Age years Sex	Occurrence	Extension	NGF Treatment	Outcome	Follow up
1	perforating trauma	35, F	4 days	4 mm	21 days	recovery	8 months
2	perforating trauma	42, M	5 days	6 mm	25 days	recovery	6 months
3	scleromacia in AR	55, F	30 days	5 mm	20 days	recovery	10 months
4	scleromacia in LES	42, M	25 days	4 mm	17 days	recovery	8 months

Studies on the effect of NGF administration in the form of collyrium for the production of aqueous humour

The effect of topical administration of NGF on the production of aqueous humour was determined first on a set of 6 rabbits with normal intraocular pressure. Using a tomography based method including a probe in anterior chamber of eye which is able to evaluate the modifications in the production of aqueous humour, it was recognised that the administration of NGF in the form of collyrium every two hours at a concentration of 200 µg/ml, in balanced saline solution, induces a five-fold increase in the production of aqueous humour. Such an increase is maintained during all the period of treatment.

On the base of the results obtained on animal model three patients with remarkable ocular hypotonia were treated, two of which showed hypotonia following surgical treatments (2 eyes) and the other as a result of a recurrent chronic uveitis. Due to very low intraocular pressure values (< 4 mm Hg),

rapidly medical conditions were degenerating to bulb phthisis. The therapeutic protocol included the instillation of one or two drops of NGF preparation (200 µg/ml) in balanced saline solution every two hours until a successful clinical outcome.

All the treated patients exhibited clear symptoms of recovery within two weeks from the beginning of NGF treatment, the intraocular pressure values being again between 8 and 12 mm Hg within 4 weeks. No patient showed the occurrence of local or systemic side effects during the treatment or the following period. Obtained data are summarised in the following table.

TABLE 3
Effect of the administration of NGF in the form of collyrium on production of aqueous humour

Pat. No.	Pathology	Age years Sex	Occurrence	NGF Treatment	Outcome	Follow up
1	vitrectomy	40, M	30 days	21 days	9 mm Hg	7 months
2	vitrectomy	53, F	25 days	25 days	10 mm Hg	11 months
3	chronic uveitis	45, F	40 days	20 days	12 mm Hg	10 months

Studies on the effect of NGF treatment in the form of collyrium for the cataract prevention

Because it has been recognised that cells of the crystalline lens capsule express the receptor with high affinity for NGF and simultaneously produce this neurotrophin, it was studied whether variations of local values of

NGF resulted in formation of crystalline lens opacity (cataract, a process usually related to senescence phenomena, diabetes, steroid treatment, traumas or physical stresses) and whether the external administration of NGF could prevent the formation or progression thereof.

To demonstrate the activity of NGF firstly a model of *in vitro* formation of cataract was used. In the study 18 crystalline lenses from adult rats were collected and incubated in a xilose containing medium. Then 6 crystalline lenses were treated by the addition to the medium of amounts of murine NGF variable between 1 and 300 pg/ml, 6 crystalline lenses were treated by the addition of amounts of anti-NGF antibody between 500 and 1000 µg and the remaining were left untreated as control. After 48 hours from the beginning of the culture it was clear that 6 crystalline lenses treated with anti-NGF antibody exhibited almost full cataract, whereas 6 control crystalline lens exhibited cortical cataract with poor involvement of nucleus of crystalline lens. The remaining 6, treated with NGF, exhibited only rare opacity traces, the best response being obtained with NGF concentration of about 200 pg/ml in culture medium.

To confirm the *in vivo* NGF activity in preventing the cataract occurrence a cataractogenesis animal model involving a diet including 30% glycerol was used. All the animals (100%) subjected to this diet exhibit a cataract within the 44th day. A group comprising ten animals was treated by three daily administrations of NGF in the form of collyrium at a concentration of 200 µg/ml in balanced saline solution, a second group again comprising ten ani-

mals was subjected to a treatment with anti-NGF antibodies injected in the anterior camera and the last group of animals was treated with saline solution in drops and was used as control.

All the rats of the group treated with anti-NGF antibody developed a cataract within the 30th day from the beginning of the experiment; all the rats treated with saline solution developed a cataract within the 45th day from the beginning of the experiment, whereas only two rats of the group treated with NGF (20%) developed a cataract within the 45th day.

Studies on the effect of NGF in the form of collyrium for retinal pathologies

To evaluate the efficacy of the NGF administration on ocular surface for retinal pathologies in a first step experiments disclosed in literature carried out on animal models were repeated using, in addition to intravitreous or retrobulbar administrations, the administration of NGF in the form of collyrium, every two hours, at a concentration of 250 µg/ml in saline balanced solution. In all the experiments both in retinal ischemic and ocular hypertonia damage NGF administered in the form of collyrium exhibited the same activity as when administered by other administration routes.

On the basis of the results obtained from animals a total of 7 patients were treated, three of which suffering from retinitis pigmentosa, one from macular foramen, two for senile atrophic maculopathy and one for myopic retinopathy. The therapeutic protocol included the instillation of one or two drops of NGF in the form of collyrium at a concentration of 250 µg/ml in ba-

lanced saline solution every two hours for 4 weeks. Treatment results were evaluated by objective examination, electroretinogram (ERG), blood flow from central retina artery (evaluated by OBF), contrast sensitivity, thickness of the layer of nervous fibers (evaluated by OCT), microperimetry and visus.

After 4 weeks of treatment all the considered parameters resulted remarkably better; particularly an improvement of ERG, blood flow, contrast sensitivity values and an increase of nervous fibers, microperimetry and visus were detected. Obtained data are summarised in the following Table 4.

TABLE 4
Effect of treatment with NGF in the form of collyrium on retinal pathologies

Patient No.	Pathology	Age years Sex	Treatment form	Treatment with NGF	ERG ¹⁾	OB ²⁾	Contrast sensitivity	OCT ³⁾	Micro perimetry	Visus
1	retinitis pigmentosa	35, F	collyrium	4 weeks	++	+	++	+	+	++
2	retinitis pigmentosa	40, F	collyrium	4 weeks	++	+/-	++	+	+	++
3	retinitis pigmentosa	32, M	collyrium	4 weeks	+++	++	++	+	++	++++
4	macular foramen	55, F	collyrium	4 weeks	+	+	+	+++	+++	+++
5	senile macular degeneration	70, F	collyrium	4 weeks	+	+/-	+	++	+++	+++
6	senile macular degeneration	73, M	collyrium	4 weeks	+/-	+/-	+	++	++	+
7	miopic retinopathy	26, M	collyrium	4 weeks	+	+	+	++	+++	+++

The values are expressed as improvement with reference to the values before the treatment with NGF: "-" = constant or worsening; "+/-" = improvement < 10 %; "+" = improvement between 11 % and 25 %; "++" = improvement between 26 % and 50 %; "+++" = improvement between 51 % and 75 %; "++++" = improvement higher than 75 %; ¹⁾ ERG = electroretinogram; ²⁾ OB = blood flow of central retinal artery; ³⁾ OCT = thickness of the nervous fiber layer.

Studies on the effect of NGF in the form of collyrium for optic nerve pathologies

To evaluate the efficacy of the administration of NGF on the ocular surface in retinal pathologies in a first step experiments carried out on animal models already disclosed in literature were repeated using, in addition to already disclosed intravitreous or retrobulbar administrations, also the administration of NGF in the form of collyrium, every two hours, at a concentration of 250 µg/ml in saline balanced solution. In all the experiments of crush and ischemic injury of optic nerve the NGF administered in the form of collyrium exhibited the same activity as when administered using other administration routes.

Based on the results obtained from animals a total of 7 patients were treated, three of which suffering from low pressure glaucoma, two from retrobulbar neuritis and two from ischemic optic neuritis. The therapeutic protocol included the instillation of one-two drops of NGF in the form of collyrium at a concentration of 200 µg/ml in balanced saline solution every two hours for 4 weeks. Treatment results were evaluated by objective examination, visual evoked potentials (VEP), blood flow from central retinal artery (evaluated by OBF), contrast sensitivity, thickness of the layer of nervous fibers (evaluated by OCT), microperimetry, visual field and visus.

After 4 weeks of treatment all the considered parameters had remarkably improved; particularly an improvement of VEP, blood flow, contrast sensitivity values and an increase of nervous fibers, microperimetry, visual field and visus were detected. The obtained data are summarised in Table 5 below.

TABLE 5
Effect of treatment with NGF in the form of collyrium on optic nerve pathologies

Pat. No.	Pathology	Age years Sex	Treatment with NGF	VEP ¹⁾	OB ²⁾	Contrast sensitivity	OCT ³⁾	Micro-perimetry	Visual field	Visus
1	normal pres-sure glaucoma	45, F	4 weeks	+++	++	++	++	++	++	++
2	normal pres-sure glaucoma	37, F	4 weeks	++	+	+	++	++	+	+
3	normal pres-sure glaucoma	42, M	4 weeks	+	++	+	++	++	++	++
4	idiopathic optic neuritis	41, M	4 weeks	++	++	+	+	++	+	++
5	idiopathic optic neuritis	38, F	4 weeks	++	++	+	+/-	+	+/-	+
6	ischemic optic neuritis	52, F	4 weeks	++	++	++	+	+/-	+	++
7	ischemic optic neuritis	58, F	4 weeks	++	++	+	++	++	+	++

Values are expressed as improvement with reference to the values before the treatment with NGF: "-" = constant or worsening; "+/-" = improvement < 19 %; "+" = improvement between 11 % and 25 %; "++" = improvement between 26 % and 50 %; "+++" = improvement between 51 % and 75 %; "++++" = improvement higher than 75 %;

¹⁾ ERG = electroretinogram; ²⁾ OB = blood flow of central retinal artery; ³⁾ OCT = thickness of the nervous fiber layer.

Studies on the effect of NGF for vitreous body pathologies

A balanced saline solution containing 250 µg/ml of NGF was administered three times a day for 4 weeks to 4 patients affected by myiodesopsia due to the presence of mobile vitreous bodies. After 4 weeks of treatment all the patients recognised a symptomatology amelioration.

Studies on the effect of NGF for choroideal pathologies

To evaluate the effect of external ophthalmic administration of NGF on choroideal pathologies an animal model of autoimmune uveitis, obtained by administration of S retinal antigen to rats, was used. A group of animals was treated every two hours with one drop of NGF in the form of collyrium at a concentration of 200 µg/ml in saline balanced solution. After 4 weeks of treatment the lesions over vitreous body-retina in animals treated with NGF in the form of collyrium were compared to those present in animals treated with saline solution. In all the animals treated with NGF a reduction of tissues lesions was clearly visible.

The present invention has been disclosed with particular reference to some specific embodiments thereof, but it should be understood that modifications and changes may be made by the persons skilled in the art without departing from the scope of protection thereof.

CLAIMS

1. Use of nerve growth factor (NGF) for the production of an ophthalmic preparation for administration over the ocular surface, for the therapy and/or the prophylaxis of pathologies affecting the intraocular tissues.

2. Use according to claim 1, wherein said ophthalmic preparation is in the form of a solution or a suspension, an ointment, a gel or a cream in a pharmaceutically acceptable ophthalmic carrier, or in the form of an ocular erodible insert or a polymeric membrane "reservoir" system to be placed in the conjunctival sac, or it is added to a local bandage together with a therapeutic contact lens.

3. Use according to claims 1 or 2, wherein said ophthalmic preparation is indicated for the therapy and/or the prophylaxis of pathologies affecting the sclera, ciliary bodies, crystalline lens, retina, optic nerve, vitreous body or the choroidea.

4. Use according to claim 3, wherein said pathologies have trophic, post-traumatic, infective, post-surgical, autoimmune, dystrophic, degenerative or post-inflammatory origin, or are originated by laser treatment.

5. Use according to any one of claims 1-4, wherein said ophthalmic preparation contains from 1 to 1000 $\mu\text{g/ml}$ of NGF.

6. Use according to claim 5, wherein said ophthalmic preparation is in the form of a collyrium and contains from 10 to 500 $\mu\text{g/ml}$ of NGF.

7. Use according to claim 6, wherein said collyrium contains 200-250 $\mu\text{g/ml}$ of NGF.

8. Use according to any one of claims 1-7, wherein the NGF in said preparation is in association with one or more other active ingredients and/or it is conjugated with a carrier molecule.

9. Use according to any one of the preceding claims wherein said NGF is of murine or of human origin, or it is human recombinant NGF.

10. Use of nerve growth factor (NGF) for the production of an ophthalmic preparation for the therapy and/or prophylaxis of intraocular tissue pathologies, except retina and optic nerve pathologies.

11. Use according to claim 10, wherein said ophthalmic preparation is indicated for the therapy and/or prophylaxis of pathologies of the sclera, ciliary body, crystalline lens, vitreous body and choroidea.

12. Use according to claim 11, wherein said pathologies have trophic, post-traumatic, infective, post-surgical, autoimmune, dystrophic, degenerative or post-inflammatory origin, or are originated by laser treatment.

13. Use according to any one of claims 1-4, wherein said ophthalmic preparation contains from 1 to 1000 µg/ml of NGF.

14. Use of nerve growth factor for therapy for intraocular tissue pathologies according to any one of claims 1-13, substantially as disclosed in the foregoing.

ROME, Jan. 29, 1999

p.p. Alessandro LAMBIASE

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

MB